DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.029
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
62 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0062-04

趋化因子SDF-1β在大肠杆菌中的表达及其纯化

郑 红[1], Stephen C Peiper[2], 朱锡华[1] ([1]第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038; [2]James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, KY, 40202 USA)

提 要:目的 重组人SDF-1β在大肠杆菌中表达并获得纯化的有生物学活性的SDF-1β蛋白。方法 以pET32a(+)-SDF-1为人SDF-1β克隆基因的表达载体,以大肠杆菌AD494(DE3)pLysS为表达菌,在IPTG诱导下表达出一个由230个氨基酸残基组成的硫氧还蛋白(thioredoxin)-SDF-1β的融合蛋白(26×10^3)。经细菌裂解、金属离子螯合亲和层析、肠激酶消化以游离SDF-1β、阳离子交换层析和逆向高效液相层析等步骤纯化目的蛋白。以蛋白印迹、纯化产物的N端氨基酸测序及配体结合试验、微生理监测术鉴定纯化产物的生化性质及生物学活性。结果 在经诱导的发酵菌中融合蛋白占总菌体蛋白的10%~15%。从1 L发酵菌液中可获得高纯度目的蛋白约400 μg。蛋白印迹实验及N端氨基酸测序皆证实纯化终产物为SDF-1β(由71个氨基酸残基组成,7.8×10^3)。配体结合试验及Cytosensor表明,该产物能与CXCR4结合[Kd=(12.20±2.99)nmol/L]并引起CXCR4表达细胞的信号传导。结论 采用本方法可获得高表达的,高纯度的具有与天然SDF-1β相似活性的重组人SDF-1β。

关键词:趋化因子;趋化因子受体;SDF-1β;CXCR4;表达;纯化
中图法分类号:R378.21;R392.2 文献标识码:A

Expression and purification of recombinant human chemokine SDF-1β in *E. coli*

ZHENG Hong, Stephen C Peiper, ZHU Xi-hua (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To obtain recombinant human SDF-1β expressed in *E. coli* and purify SDF-1β with biological activity from the bacterium. **Methods** A thioredoxin-SDF-1β fusion protein(26×10^3) composed of 230 amino acid residues was expressed in *E. coli* AD494(DE3)pLysS under the induction of IPTG when pET32a(+)-SDF-β was used as an expression vector. Purified SDF-1β was produced through following procedure: bacteria lysis, metal-chelated affinity chromatography(MAC), enterokinase digestion to free SDF-1β from fusion protein, cation exchange chromatography (CEC) and reverse-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC). Western blotting with anti-SDF-1β monoclonal antibody(mAb), N-terminal amino acid sequencing, ligand-binding assay and Cytosensor/microphysiometry were used to investigate the biochemical characters and biological activities of the purified SDF-1β. **Results** About 10%—15% of total bacterium protein was expressed as fusion protein. Approximately 400 μg purified SDF-1β(7.8×10^3) consisting of 71 amino acid residues were produced from 1 liter of fermented bacteria. Western blotting showed that anti-SDF-1β mAb could bind with the purified SDF-1β specifically. N-terminal amino acid sequencing indicated that N-terminus of purified SDF-1β possessed as the same amino acid sequence as nature one. Purified SDF-1β not only had the binding activity with CXCR4 expressing cells[Kd=(12.20±2.99) nmol/L], but also could activate CXCR4 expressing cell signaling specifically in a dose-dependence manner. **Conclusion** The purified recombinant human SDF-1β produced with this method possesses biochemical characters and biological activities as same as those nature human SDF-1β.

Key words: chemokine; chemokine receptor; SDF-1β; CXCR4; expression; purification

趋化因子(Chemokines)是一类对免疫细胞具有趋化作用的细胞因子。在淋巴细胞的定向迁移,造血细胞、免疫细胞的发育和分化,炎症的发生,血管的生成及肿瘤的发生中分别起着不同的作用[1~3]。通常当成纤维细胞、免疫细胞、内皮细胞等受到各种刺激物如生长因子、干扰素、病毒产物以及细菌产物的诱导时,就可产生并分泌出不同的趋化因子。趋化因子的功能行使由趋化因子受体(Chemokine receptors)介导。趋化因子SDF-1(Stromal cell-derived factor 1)及其受体CXCR4广泛地、组成性地表达于多种细胞和组织中,包括免疫细胞、脑、心脏、肾、肝、肺及脾,在免疫系统、循环系统、及中枢神经系统的发育中起至关重要的作用[4]。而且CXCR4还是HIV 1型(HIV-1)中T淋巴细胞嗜性株(T-tropic)所利用的主要辅助受体。体外实验表明,SDF-1能抑制HIV-1利用CXCR4辅助受体进入和感染$CD4^+$ T细胞,并在体内实验中证实SDF—1能够延缓爱滋病(Acquired immunological deficient syndrome, AIDS)的发展进程[5]。鉴于SDF-1/CXCR4在机体发育及疾病中的重要作用,为便于研究其结构与功能,我们以pET32a(+)为人SDF-1β克隆基因的表达载体,在大肠杆菌中经诱导后高效表达出一个硫氧还蛋白(Thioredoxin)-SDF-1β的融合蛋白,经酶切、纯化后,获得了高纯度的有生物学活性的目的蛋白SDF-1β。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 表达质粒 大肠杆菌表达质粒pET32a(+),美国Novagen公司产品。

1.1.2 表达菌 AD494(DE3)plysS,美国Novagen公司产品。

1.1.3 表达CXCR4的CHO细胞株 自构建。各种培养基,美国GIBCOBRL公司产品。培养细胞所用耗材,美国Falcon产品。

作者简介:郑 红(1961—),女,四川省灌县人,博士,副研究员,主要从事趋化因子生物学方面的研究,现在第三军医大学附属西南医院综合实验研究中心工作,发表论文15篇。电话:(023)68754437

收稿日期:2000-10-17;修回日期:2000-11-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.4　主要试剂与器材　　青霉素、卡那霉素、氯霉素、百日咳毒素、IPTG、TFA、CH_3CN 等各化学试剂为美国 Sigma 公司产品。SOC 培养基, 美国 GIBCO-BRL 产品。TALON™ MAC 凝胶, 美国 Clontech 公司产品。肠激酶(Enterokinase), 德国 Boehringer mannheim 公司产品。离心浓缩管(Centrifugal Concentrators), Centriprep®, 美国 Amicon 公司产品。PVDF 转移膜(0.2 μm), 美国 Millipore 公司产品。除盐柱: HiTrap 5 ml, 美国 Pharmacia 公司产品。阳离子交换柱: S Hyper D 10, Beckman 公司产品。逆相高效液相分离柱: SynChropak RP-4-1000, 美国 MICRA Scientific Inc. 产品。^{125}I-SDF-1β, 美国 Du Pont-NEN 公司产品。γ-计数器: CPBRA Ⅱ Auto-Gamma, 美国 PACKARD 公司产品。高效液相色谱仪(HPLC): DU-62 SectrophotometerHPLC Biosys 510, 美国 Beckman 公司产品。氨基酸序列自动分析仪: AminoAnal 58-210, 美国 Beckman 公司产品。微生理仪: Cytosensor® Microphysiometer, 美国 Molecular Devices 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　pET32a(+)-SDF-1β 质粒的构建　　人 SDF-1(基因由 Dr. Peiper 实验室从人骨髓细胞克隆而得, 其 cDNA 顺序同文献[6]。pET32a(+)在其硫氧还蛋白的下游有外源基因插入位点, 并可表达一个含插入基因的融合蛋白。融合蛋白中有 6 个组氨酸肽段和肠激酶酶切位点的。成熟 SDF-1β 基因分别在 N 端以 *Nco*Ⅰ、在 C 端以 *BamH*Ⅰ 插入 pET32a(+)。待表达的融合蛋白共由 230 个氨基酸残基组成。

1.2.2　pET32a(+)-SDF-1β 在大肠杆菌中的表达　　用确认的 pET32a(+)-SDF-1β 质粒 0.5 μg 转化感受态大肠杆菌 AD494(DE3)plysS, 于 LB 平板(青霉素、卡那霉素、氯霉素三抗性)上培养, 37 ℃过夜。单个转化菌落经一次增殖培养后, 取 100 μl 加入 3 ml LB 中, 37 ℃摇动培养。待悬液 D_{600nm} 达 0.6 时, 加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)。继续培养, 3 h 后, 将离心沉淀的菌体悬于 1/10 倍培养体积的 PBS 中。取 25 μl 并加入等体积的 SDS-PAGE 上样液中, 97 ℃ 5 min, 2 μl/孔上样于 15% 的 tricine 胶上。电泳后固定、银染。

1.2.3　SDF-1β 的纯化

1.2.3.1　裂解　　1 L 发酵菌液之菌体悬浮于 100 ml 裂解液中(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1% TritonX100)。冰盐浴上超声裂菌。待菌液粘度下降后, 32 000× *g* 离心 15 min, 4 ℃。收集菌液上清。

1.2.3.2　融合蛋白在 MAC 凝胶上的吸附和浓缩　　在 100 ml 裂解菌液上清中加入 5 ml 柱床体积的 MAC 凝胶, 孵育 40 min 后, 500× *g* 离心。用洗液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mol/L NaCl)洗凝胶两次。以含 100 mmol/L EDTA 洗脱液洗脱下融合蛋白。离心浓缩(MWc 10 000)至约 6 ml 后, 上除盐柱, 用洗脱液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)洗脱下蛋白组分。取小样进行 SDS-PAGE。

1.2.3.3　肠激酶酶切融合蛋白释放 SDF-1β　　调整上述融合蛋白浓缩液浓度为 1 mg/ml, 加入 1 μg/ml 肠激酶, 37 ℃酶解 3~6 h。取小样进行 SDS-PAGE。

1.2.3.4　阳离子交换层析(CEC)　　酶裂解液经 B 泵上入 S Hyper D 柱。经 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.4 洗柱后, 用 50~950 mmol/L NaCl 连续梯度溶液以流速为 1 ml/min、并在 25 min 内洗脱下蛋白。分部收集洗脱组分, 1 管/min。

1.2.3.5　逆向-高效液相层析(RP-HPLC)　　上述含 SDF-1β 组分经 HPLC 进样口上样入 RP-4-1000 柱。用 0.1% TFA 水溶液以流速为 1 ml/min 洗柱。洗脱用 3.5%~66.5% CH_3CN 连续梯度以流速为 1 ml/min 在 30 min 内洗脱下蛋白, 分部收集洗脱组分, 1 管/min。合并 SDF-1β 组分, 测定蛋白量, 分装, 冻干。

1.2.4　确定表达的 SDF-1β

1.2.4.1　蛋白印迹　　冻干的 SDF-1β 纯化产品上样进行 SDS-PAGE, 1 μg/孔, 4 ℃下, 恒压 36 V 过夜电转移于 PVDF 膜上。转膜经 5% 脱脂奶-TTBS 封闭 1 h; 0.2 μg/ml 羊抗人 SDF-1β IgG 孵育 37 ℃, 1 h; TTBS 洗膜后; 鼠抗羊 IgG-HRP 孵育 37 ℃, 1 h; 再洗膜; 经加底物, 压片等步骤后, 观察结果。

1.2.4.2　N-端氨基酸分析　　纯化的 SDF-1β 上样进行 SDS-PAGE, 1 μg/孔, 转移于 PVDF 膜上, 考马思亮蓝(Commassi Blue)染色、脱色后, 干膜。用氨基酸序列分析仪对电泳条带进行 N-端氨基酸顺序分析。

1.2.4.3　配体结合试验　　在一系列试管中各加入 0.4 nmol/L 的[^{125}I] SDF-1β(热)、5× 10^6/ml CXCR4 CHO 表达细胞悬液 100 μl。然后分别于各管内加入从稀浓度到高浓度的纯化的 SDF-1β(冷), 使各管的冷 SDF-1β 的终浓度依次为 0、0.01、0.1、0.25、0.50、0.75、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、25、50、75、100、300、500、1 000 nmol/L。于 4 ℃冷室内摇动孵育 1 h 后, 将各管内的悬液转铺于已加有 100 μl 预冷混合石蜡油(石蜡油/硅油的比例为 9∶1)的 0.5 ml 塑料离心管内, 12 000 r/m 离心 5 min 分离游离的与结合到细胞上的热 SDF-1β。将各管管底剪下并依次转入新的试管内, γ-计数器记数。

1.2.4.4　信号传导实验　　将表达 CXCR4 的 CHO 细胞制备成 3× 10^5/ml 的细胞悬液。分别于放有网杯的 12 孔板的各孔内滴加 1 ml 细胞悬液、各孔从网杯外加入 2 ml 生长培养基(10% 胎牛血清、100 μg/ml 青/链霉素的 MEMα, pH7.4)。37 ℃, 5% CO_2 过夜培养。次日, 在测试前 4 h 更换成无血清的培养基后继续培养。测试前, 将分别载有两个 CXCR4 细胞、一个 CXCR2 细胞和一个 CCR5 表达细胞的网杯转入 Cytosensor 仪器的样品槽内, 启动仪器管道传输及测试系统并待其平衡后, 分别从管道路径加入 10 nmol/L, 或 5 nmol/L SDF-1β。用工作培养基[45 mmol/L NaCl, 1 mg/ml BSA, 100 μg/ml 青/链霉素的 MEMα(无缓冲体系)]运行 20 min 后, 重复上述操作 3 次, 分别引入 1 nmol/L, 或 0.5 nmol/L SDF-1β; 20 nmol/LSDF-1β+百日咳毒素 10 μg/ml; 20 nmol/L SDF-1β+抗人 CXCR4 单克隆抗体 12G5 20 μg/ml, 或+抗人 IgG 单抗; 按程序标准化酸化率数据。

2　结果

2.1　表达与纯化

2.1.1　从随机挑选的质粒转化克隆株表达的目的蛋白-SDF-1β 的情况来看, 诱导与未诱导样之间差异明显。诱导蛋白占总蛋白的 10%~15%。经 MAC 吸附后, 大部分的杂蛋白仍在菌液中, 而融合蛋白占洗脱下蛋白的 50% 以上, 见图 1。

2.1.2　经系列肠激酶浓度实验, 以 37 ℃, 1 μg/ml 为最佳酶浓度条件。从酶作用时间上看, 在作用 6 h 内变化不大, 但从作用 20 h 的取样来看, 融合蛋白的降解变性程度严重。因此, 选定的最佳酶切条件为: 37℃下, 酶浓度 1 μg/ml, 3~6 h, 见图 2。

2.1.3　合蛋白酶解液上样进阳离子交换柱 S Hyper 柱时, 在所选的吸附与洗脱条件下, 杂蛋白流经柱子, SDF-1β 先被吸附, 后被洗脱下来。

2.1.4　纯化的最后一步采用 RP-HPLC。在所选条件下, 洗脱主蜂为 SDF-1β。

2.2　纯化 SDF-1β 的鉴定

2.2.1　蛋白印迹实验结果显示, 纯化的蛋白产物能与羊抗人 SDF-1β 抗体产生阳性信号, 见图 3。氨基酸序列自动分析仪测

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

定证实了纯化 SDF-1β 的正确的 N-端序列。一次整个分离纯化过程的情况见表 1。纯度和得率都可观。采用该纯化系统可获得足够研究用量的目的蛋白 SDF-1β。

2.2.2 在配体结合试验中，抑制曲线表明，纯化的 SDF-1β（冷）能够随着其浓度的增加逐步抑制并替代标记的 SDF-1β（热）与 CXCR4 表达细胞的结合。从 Schatchard 直线的斜率可得到 SDF-1β 与 CXCR4 结合的解离常数 Kd，见图 4。统计 11 次配体结合试验结果，纯化的 SDF-1β 与其受体 CXCR4 结合的结合常数 Kd =（12.20±2.99）nmol/L。

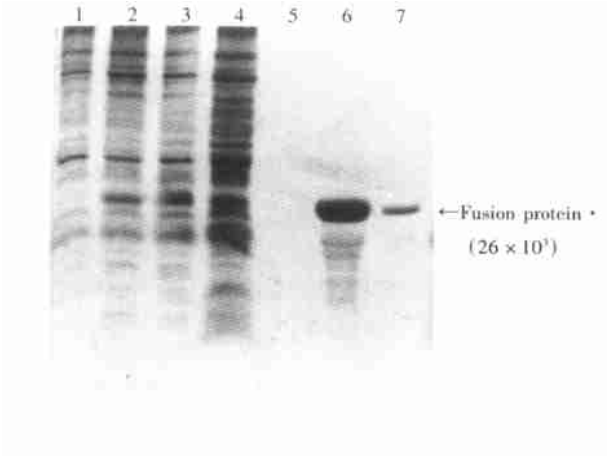


图 1 发酵菌中的融合蛋白及经 MAC 后洗脱下的融合蛋白

Fig 1 Fusion protein in fertilized bacteria and that in eluate after MAC

Lane 1: Total proteins of the non-induced fertilized bacteria; Lane 2: Total proteins of the induced fertilized bacteria; Lane 3: Proteins in supernatant of the bacterial lysis; Lane 4: Protein in supernatant after mAc; Lane 5, 6, 7: Eluate components after mAc

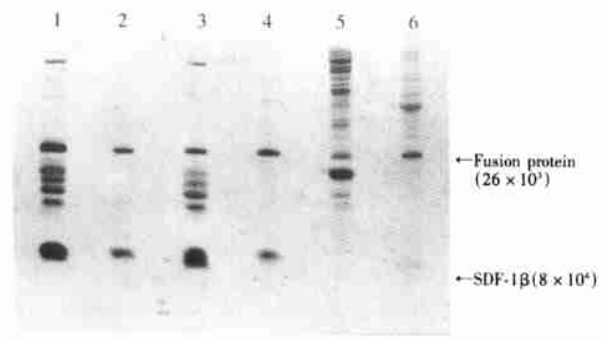


图 2 肠激酶切列产物

Fig 2 SDS-PAGE for proteins digested with enterokinase

Supernatants and pellets of the fusion protein solution treated with enterokinase (1 μg/ml) at 37 ℃ for 1 h (lane 1, 2), 6 h (lane 3, 4), and 22 h (lane 5, 6)

表 1 一次纯化流程中各纯化步骤获得的蛋白量和纯度

Tab 1 Protein concentration and purity of every step from one batch

Step	Volume (ml)	Concentration (mg/ml)	Total protein(mg)	Purity (%)
Cell lyste	100	7	700	5
MAC	18	1	18	50
S Hyer D	6	0.075	0.45	95
RP-HPLC	3.5	0.11	0.385	99

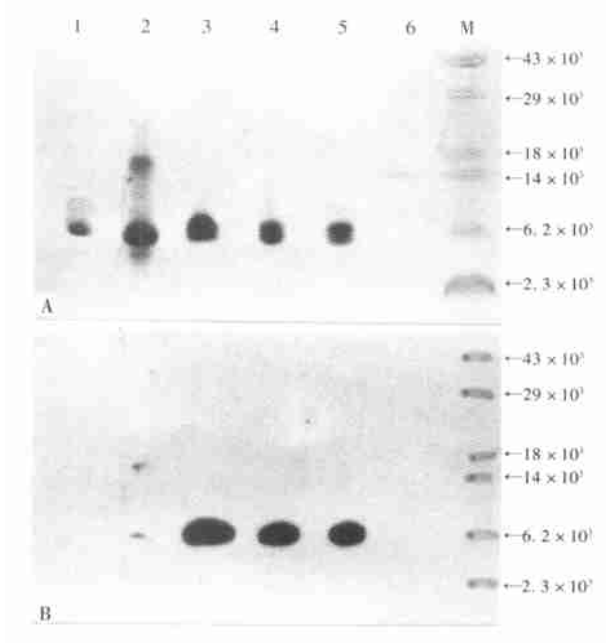


图 3 纯化终产物小样的电泳结果及对应样品的抗 SDF-1β 抗体的蛋白印迹

Fig 3 SDS-PAGE gel and corresponding western blotting of final purified SDF-1β

A: SDS-PAGE gel; B: Western blotting after SDS-PAGE with the same sample from A; Lane 1: vMIP Ⅱ; Lane 2: SDF-1α; Lane 3, 4, 5: Purified SDF-1β in different batches; Lane 6: Thioredoxin; Western blating indicated positive reaction with purified SDF-1β, cross reaction with SDF-1α and negative reaction with vMIP Ⅱ and thioredoxin with anti-SDF-1β mAb

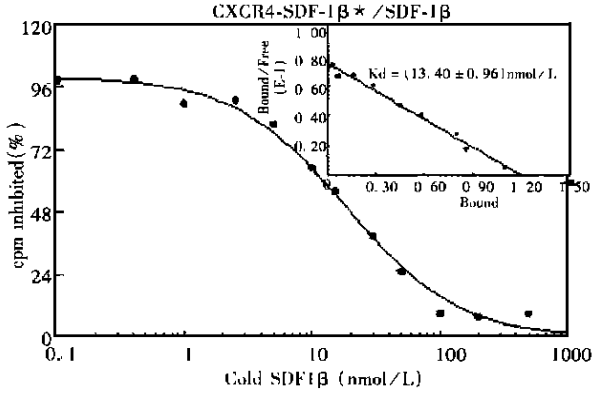


图 4 纯化的 SDF-1β 与 CXCR4 的结合试验

图 4 Ligand-binding assay of purified SDF-1β and CXCR4

The inhibition curve and the Schatchard were one representative of 11 different ligand-binding assay. In inhibition curve, X axle is the increasing concentration of purified SDF-1β, Y axle is the percentage of cpm ratio of labeled SDF-1β (hot) binding CXCR4 at certain concentration of purified SDF-1β (cold). In scatchard, X axle is the total bound SDF-1β (hot + cold), Y axle is the ratio of the total bound to free SDF-1β

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.3　微生理仪测试结果表明, 当用纯化的 SDF-1β 以不同浓度刺激表达 CXCR4 细胞时, 有剂量依赖性信号显现; 这信号可被百日咳毒素、CXCR4 单抗所抑制; 证明纯化的重组 SDF-1β 具有天然 SDF-1β 的活性, 见图 5。

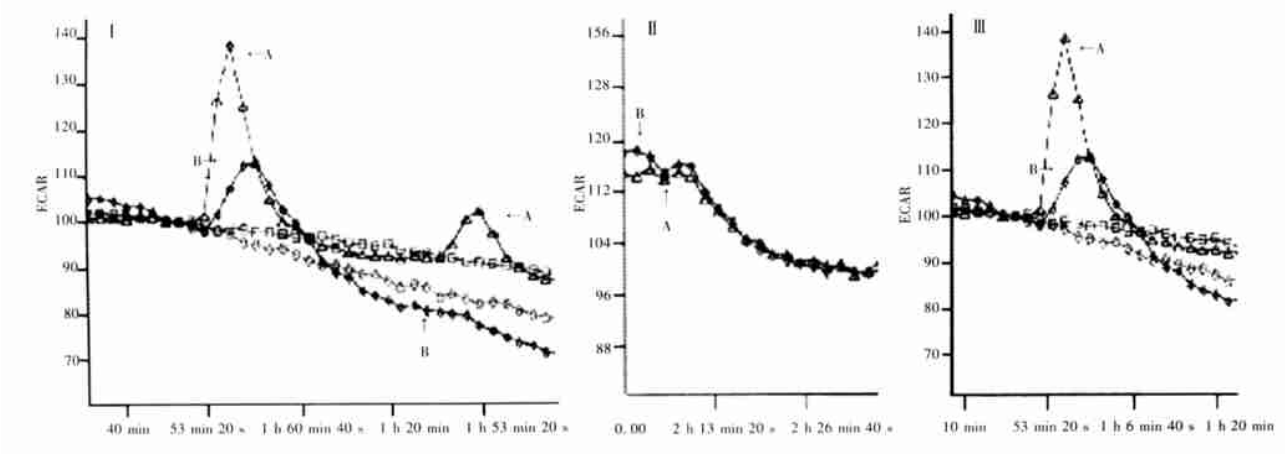


图 5　纯化的 SDF-1β 刺激受体细胞后细胞的应答

Fig 5　Extracellular acidification rate (ECAR) records of cells responding to the stimulation from purified SDF-1β with Cytosensor

Ⅰ: A and B were two CXCR4 expressing cells. The left peaks represent ECARs when activated with SDF-1β of [10 nmol/L] (A), [5 nmol/L] (B); The right peaks show ECARs when activated of 1 nmol/L(A), 0.5 nmol/L(B). Ⅱ: Shows no response when cells activated with [20 nmol/L] SDF-1β plus anti-CXCR4 monoclonal antibody 12G5 (20 μg/ml), or PTX (10 μg/ml). Ⅲ: The another responses when the cells activated again with SDF-1β of [10 nmol/L] (A), [5 nmol/L] (B). The other 2 control cells quietly when activated were CXCR2 and CCR5 expressing cells saperately

3　讨论

重组 SDF-1β 的纯化共有 5 个步骤。因为融合蛋白结构中存在富含自由电子对的 His-tag, 可用 TALON™的 MAC 树脂凝胶所螯合的过度金属离子以其配位键特异吸附并浓缩融合蛋白; 肠激酶能专一地裂解融合蛋白中-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-↓-X-键并释放出游离的 SDF-1β; 融合蛋白的 pI 为 8.1, 经肠激酶酶切后, 硫氧还蛋白的 pI 为 5.8, SDF-1β 为 10.75。根据蛋白的离子特性, 所选用的阳离子交换分离环境效果良好; 最后根据蛋白分子的疏水性, 选用 RP-HPLC 使 SDF-1β 的纯度达到 99%。

对纯化的产物, 不仅需要从结构上证实它是目的蛋白, 而且还需要从生物学活性上证实它具有目的蛋白的活性。配体结合试验表明纯化的 SDF-1β 与其受体 CXCR4 的结合解离常数 Kd = (12.20 ± 2.99) nmol/L, 而且当以 1 nmol/L 纯化的 SDF-1β 刺激 CXCR4 表达细胞时即可引起信号传导, 与迄今报道的结果一致[7]。证实了所纯化的重组 SDF-1β 具有与天然蛋白相同的生物学活性。采用本研究的表达、纯化系统, 从 1 升发酵菌液中可获得约 400 μg 有生物学活性的 SDF-1β 纯品, 为进一步的研究奠定了基础, 并为其它趋化因子的表达与纯化及配体-受体研究建立了良好的技术方法和模式。

参考文献:

[1] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic[J]. Nature, 1998, 392(6679): 565-568.

[2] Bacon K B, Oppenheim J J. Chemokines in disease models and pathogenesis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 1998, 9(2): 167-173.

[3] Wang J M, Deng X, Su S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis[J]. J Immunol Meth, 1998, 220(1): 1-17.

[4] Horuk R. Chemokines beyond inflammation[J]. Nature, 1998, 393(6685): 524-525.

[5] Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, *et al*. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1[J]. Nature, 1996, 382(6594): 833-835.

[6] Shirozu M, Nakano T, Inazawa J. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene[J]. Genomics, 1995, 28(3): 495-500.

[7] Hesselgesser J, Liang M, Horuk R. Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell line: ligand binding, biological activity, and HIV 1 infectivity[J]. J Immunol, 1998, 160(2): 877-883.

(编辑　冯崇英)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net